

有用マルトオリゴ糖誘導体の酵素合成と利用に関する研究

著者	小川 浩一
号	461
発行年	1992
URL	http://hdl.handle.net/10097/16671

氏 名(本籍) 小^お 川^{がわ} 浩^{こう} 一^{いち}

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 4 6 1 号

学位授与年月日 平 成 4 年 10 月 8 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 有用マルトオリゴ糖誘導体の酵素合成と
利用に関する研究

論文審査委員(主 査) 教 授 目 黒 熙
教 授 大久保 一 良
教 授 山 内 文 男

論文内容要旨

＜序論＞

タンパク質の一次構造の解析、X線回折などの立体構造解析技術やクロマトグラフィー等の精製技術が進歩すると共に、多くの有用酵素が発見され、その分子構造や作用機構、酵素特性に関する詳細な情報が蓄積されてきている。なかでもアミラーゼは人間の主要なエネルギー源であるデンプンの消化に、またデンプンを原料とした様々な食品製造に、古くから利用され、かつ研究されてきた酵素である。アミラーゼはそのデンプンに対する水解特性により、低分子のデキストリン・マルトースおよびグルコースを生成する α -アミラーゼ、マルトースのみを生成する β -アミラーゼ、グルコースのみを生成するグルコアミラーゼ等に分類されてきた。最近でも次々と新しいアミラーゼが発見されその作用形式や触媒機構が分子レベルで研究されている。本酵素の触媒機構の研究には、重合度の異なるマルトオリゴ糖（D-グルコース単位が α -1,4グルコシド結合した直鎖オリゴ糖）あるいはその誘導体が基質としてよく用いられる。これら構造の明確な比較的 low molecular weight の基質に対する酵素の水解様式や速度論量を解析し、アミラーゼのサブサイト構造、あるいは触媒機構を考察する研究は今まで数多く報告されている。また実用面ではマルトオリゴ糖誘導体がヒト血清中の α -アミラーゼ活性測定用基質として臨床酵素診断に広く用いられており、アミラーゼの研究、臨床診断等の分野で、その有用性は極めて高いものとなっている。

一方、近年酵素反応を人為的に制御し、今まで利用されてなかった酵素の潜在的能力を引き出すような酵素の新機能開発に関する研究が盛んに試みられている。こうした状況の中で筆者は通常、糖質加水分解酵素として作用する α -アミラーゼや β -D-ガラクトシダーゼが人為的制御下で位置選択的な合成を行うことを見いだした。そこでこのような糖転移反応を利用し、アミラーゼ基質アナログとなるマルトオリゴ糖誘導体の効率的で簡易な合成法を開発することを目的として本研究を行った。まず各種マルトオリゴ糖誘導体（重合度4～7）の効率的な酵素合成法を検討した（第一章）。

ヒト α -アミラーゼは主に膵臓および唾液腺で合成され膵液、唾液中に分泌されるが、これら臓器の疾患時に血中および尿中の α -アミラーゼ活性が上昇することが報告されており、この現象を利用した膵疾患等の臨床診断が広く行われている。現在、本酵素活性測定法としては

-ニトロフェノールなどの発色団をマルトオリゴ糖の還元末端に結合した基質を用い、 α -アミラーゼの水解により生じる一次生

成物をさらに共役酵素 α -D-グルコシダーゼを用い水解させ、その結果生じる

ニトロフェノールによる400nm付近の吸光度の増加を検出する共役酵素法が主流となってきた(Fig. 1)。このような共役酵素を用いる測定法は反応速度論的アッセイが可能であるため、血清中のグルコース、マルトースなどの妨害物質による影響が減少し、しかも自動分析装置への適応性に優れているなど数々の利点がある。

しかし本法の問題点として、共役酵素が基質であるマルトオリゴ糖誘導体自身を僅かづつではあるが分解し、試薬が不安定であることが挙げられている。そこで、第一章で合成したマルトオリゴ糖誘導体を原料として用い、共役酵素の水解を受けずに α -アミラーゼ測定可能な新規基質の酵素合成法を開発した〈第二章〉。〈第三章〉ではより正確な臨床診断を目的としたヒト唾液腺および膵臓由来アミラーゼの分別定量法を確立した。

またこれら修飾基質に対するエキソ型アミラーゼ、ブタ膵臓アミラーゼの水解作用についても検討し、その水解特性に考察を加えた〈第四章〉。

〈第一章〉 マルトオリゴ糖誘導体の酵素合成

α -アミラーゼの臨床化学的測定法として、1980年代に入りマルトオリゴ糖誘導体(特に重合度4~7)のような合成基質を用いる共役酵素法が主流となってきたため、この種の基質の大量製造法が求められている。現在までに報告されているこれら基質の有機合成法は工程が繁雑で、特殊な装置が必要であるなど大量合成には必ずしも適した方法とは言えない。それに対し酵素合成法は特殊な装置を必要としないうえ、反応が特異的で副生成物が少なく、原料の回収再利用も容易であるなどの利点が考えられる。そこで筆者は各種起源マルトオリゴ糖生成アミラーゼの特異な糖転移反応を利用して、マルトオリゴ糖を供与体基質、*p*-ニトロフェニル α -D-グルコピラノシド(GP)を受容体基質として、一連の重合度(4~7)を有する4種類の還元末端修飾基質の合成を試みた。すなわち*Streptomyces griseus*起源マルトトリオース生成アミラーゼにより*p*-ニトロフェニル α -マルトテトラオシド(G4P)を、*Pseudomonas stutzeri*起源マルトテトラオース生成アミラーゼにより*p*-ニトロフェニル α -マルトペンタオシド(G5P)を、*Bacillus licheniformis*起源マルトペンタオース生成アミラーゼにより*p*-ニトロフェニル α -マルトヘキサオシド(G6P)を、*Klebsiella pneumoniae*起源マルトヘキサオース生成アミラーゼにより*p*-ニトロフェニル α -マルトヘプタオシド(G7P)をそれぞれ従

来達し得なかった効率で酵素合成に成功した(Fig. 2)。 反応生成物の定量にはHPLC、分離精製には各種クロマトグラフィーを用い(Fig. 3)、構造解析はNMRなどにより行った。 これらの反応系の合成メカニズムは、Fig. 4のG5P合成反応推定機構に示したようにまず酵素と供与体基質が酵素-マルトテトラオシル複合体を形成し、これに大過剰のGPが受容体基質としてアタックすることにより糖転移反応が進行すると考えられる。 本糖転移反応の目的化合物の生成量は有機溶媒の種類および濃度、反応温度、pHなどに大きく影響され(Fig. 5)、それぞれの酵素により反応条件に多少の相違が見られた(Table 1)。 この反応系への、メタノール(MeOH)あるいはジメチルスルホキシド(DMSO)などの親水性有機溶媒を適量添加することは受容体基質の溶解度を向上させ高基質濃度での反応が可能となり、無添加系と比較して糖転移反応物の収率が2~9倍に高められた。

＜第二章＞ 新規ヒトアミラーゼ測定基質の開発

実際の臨床用基質として、第一章で合成したようなマルトオリゴ糖誘導体を共役酵素(α -D-グルコシダーゼ)とともに用いる場合、基質自体が共役酵素により僅かづつではあるが水解されるためブランク値が上昇すること、そのため十分量の共役酵素を用いることができない点が問題とされている。 この欠点を解決するため、最近マルトオリゴ糖誘導体の非還元末端グルコシル残基へのベンジリデン基、ベンジル基などの導入が有機合成法により検討されている(Fig. 6)。 これら修飾基質は α -アミラーゼの水解作用は受けるが、 α -D-グルコシダーゼやグルコアミラーゼの水解作用をブロックするため、十分量の共役酵素を反応系に使用することが可能となり優れた分析適応性を有している。 そのため、現時点ではこれら基質は理想的な活性測定用基質とされているが、その有機合成法は工程が煩雑で収率が低く、しかも修飾基自体が不安定であるなどの問題点を有している。

そこで筆者は先に合成法を開発したG5Pを原料基質とし、酵素による非還元末端修飾を試みた。 すなわちラクトースを供与体基質、G5Pを受容体基質として用い、*Bacillus circulans*起源 β -D-ガラクトシダーゼの糖転移反応を利用し、G5Pの非還元末端グルコシル残基の修飾を行った(Fig. 7)。 本酵素反応初期には高い選択性でG5Pの非還元末端グルコシル残基のC-4にガラクトシル転移した

-ニトロフェニル 4⁵-O- β -D-ガラクトピラノシル- α -マルトペンタオシド(LG5PI)が生成し、反応後期には同じくC-6にガラクトシル転移した

-ニトロフェニル 6⁵-O- β -D-ガ

ラクトピラノシル- α -マルトペンタオシド(LG5PII)が優先的に生成した(Fig. 8)。すなわち両生成物がそれぞれ最大に達した時点の反応液を順次カラムクロマトグラフィーに供し、新規化合物LG5PIとLG5PIIを分離、精製した(Fig. 9)。

臨床基質としての有用性を検討するため、LG5PIとLG5PIIに対するヒト唾液 α -アミラーゼ(HSA)とヒト膵臓 α -アミラーゼ(HPA)の水解作用について検討した。比較サンプルとして非還元末端を修飾していないG5Pを用いた。LG5PIおよびLG5PIIは予想したように共役酵素 α -D-グルコシダーゼ、グルコアミラーゼの水解作用を全く受けなかった。両基質に対するHSA、HPAの水解様式と速度論量をHPLCにより測定した結果、LG5PIに対するHSAとHPAの水解様式は両酵素間で有意差は見られなかったが、LG5PIIでは明かな有意差が見られた(Fig. 10, 11)。さらにG5Pと比較してLG5PIは K_m が減少し V_{max} はほぼ同程度であったが、LG5PIIでは K_m が増大し、 V_{max} は低下した(Table 2)。つまりLG5PIの場合、C-4位に結合した β -D-ガラクトシル残基は α -アミラーゼの作用にとってなんら障害にならないが、LG5PIIのようにC-6位に結合したそれは α -アミラーゼの水解に障害となっていることが判った。実際に共役酵素の共存下、ヒト血清を用いてLG5PI、LG5PIIを水解させ、一定時間後の400nmにおける吸光度を測定した結果、ヒト血清濃度と吸光度の間に良好な直線関係が認められた(Fig. 12)。またLG5PIの感度はLG5PIIの約2.5倍であった。以上の結果から特に、LG5PIは共役酵素の影響を受けない分析適応性に優れた新規アミラーゼ活性測定基質となりうることが判明した。本基質の製造方法は安価に入手可能なラクトースと市販酵素標品による反応であり、一段階の操作で簡便に目的生成物を合成可能であったので有望な工業的生産方法として期待される。

<第三章> ヒトアミラーゼの分別定量法

ヒト α -アミラーゼには唾液線由来(HSA)および膵臓由来(HPA)のアイソザイムが存在するため、臨床診断上これら酵素の分別定量を行うことは正確な病態を把握するための有力な手段である。両酵素のアミノ酸残基には94%のホモロジーがあり、水解様式も良く類似していると報告されている。従来、本酵素の分別定量法としては電気泳動法、等電点分画法、クロマトグラフィー法などが考案されているが、これらの測定法は測定操作が煩雑で自動分析計への適合性が困難であることから、簡便で迅速な方法が求められている。また、蛍光性マルトオリ

ゴ糖誘導体に対する両酵素の切断様式の相違に基づいて分別定量を行う方法が報告されているが、本基質の調製法は複雑な工程を要するので、十分量の基質を提供するには適当な方法とは言えなかった。

そこで筆者は上記LG5PIIに対するHSA、HPA切断様式の相違に基づいて、本基質を利用したヒトアミラーゼの分別定量を試みた。第二章での検討の結果、両酵素はLG5PIIを水解して、*p*-ニトロフェニル α -マルトシド(G2P)とGPを生成するが、HPAはHSAに比較してより多くのGPを生成した(Fig. 13)。そこでHSAおよびHPAを適当な割合で混合しLG5PIIに作用させ反応初段階での水解物をHPLCに供し、生成したG2PおよびGPの生成比を算出した。この際、両酵素の混合比と水解物GP/G2Pをプロットすると良好な直線関係が得られた(Fig. 14)。実際にヒト血清を用いてLG5PIIを加水分解した後、生成物をHPLCで測定し、上記直線式よりヒトアミラーゼの混合比を算出した結果、既報のクロマトグラフィー法により分別定量した測定値と良い相関を示した。以上のようにLG5PIIはヒト血清中のHSAとHPAの分別定量用基質として利用可能である。

<第四章> 非還元末端修飾基質に対するアミラーゼ の水解特性の解析

酵素合成した新規非還元末端修飾基質に対するアミラーゼの水解特性を解析することにより、酵素のサブサイト構造に関する知見を得ることが可能であると考え、各種アミラーゼのこれら基質に対する速度論量を測定した。

一般にエキソ型アミラーゼと言われる酵素は澱粉鎖を非還元末端側から、順次分解していく。これらの酵素は糖鎖の非還元末端を認識していると推定されているが、筆者が酵素合成した非還元末端修飾基質LG5PIおよびLG5PIIに対して各種エキソ型アミラーゼがどのように作用するか興味深い。そこで、酵素としてマルトース単位で澱粉を分解する β -アミラーゼ、マルトトリオース単位で分解するマルトトリオース生成アミラーゼ、マルトテトラオース単位で分解するマルトテトラオース生成アミラーゼを用い、修飾基質に対する相対水解速度と水解様式をHPLC分析によって求めた。またブタ膵臓 α -アミラーゼ(PPA)とヒト膵臓 α -アミラーゼ(HPA)は、至適pHは同じくpH 6.9、分子量も同じく54,000と相同性の高い動物アミラーゼである。そこで、両酵素の修飾基質LG5PI、LG5PIIに対する速度論量を求め、両酵素間のサブサイト構造の相違を検討した。比較のため、G4P、

G5P、G6Pについても基質として用いて同様に検討した。

3種類のエキソ型アミラーゼの基質に対する相対速度と水解様式をTable 3およびFig. 15に示した。 β -アミラーゼはLG5PIおよびLG5PIIに全く作用できなかった。 G_3 生成アミラーゼはLG5PIIにはほとんど作用できなかったが、LG5PIには水解速度は減少するが作用できた。 G_4 生成アミラーゼはLG5PI、LG5PII両基質に対して、水解速度は減少するものの作用した。以上のように、 β -アミラーゼは基質の認識が非常に厳格であるが、一方、 G_3 生成アミラーゼ、 G_4 生成アミラーゼの基質に対する認識は多少融通性があることが判った。

PPA、HPAの基質に対する速度論量および水解様式をTable 4およびFig. 16に示した。その結果、両酵素のG4P、G5P、G6P、LG5PIに対する水解様式はほぼ似ていたが、LG5PIIではかなりの相違が見られた。PPAでは主にLG5PIIのガラクトシル残基をグルコースのように認識した水解様式が観察されたが、HPAの場合は同じガラクトシル残基をサブサイトから排除するような水解様式が観察された。また、相対的にPPAの方がHPAより、マルトオリゴ糖誘導体基質との親和性が高かった。以上のように、両酵素間において、特にLG5PIIに対しての速度論量や切断頻度の相違が認められたことから、本基質のガラクトシル残基が取り込まれるサブサイト付近の構造あるいはアミノ酸残基の相違が推定された。

以上のように非還元末端修飾基質に対する各種アミラーゼの速度論量を測定することにより、そのサブサイト構造を考察することが可能であった。

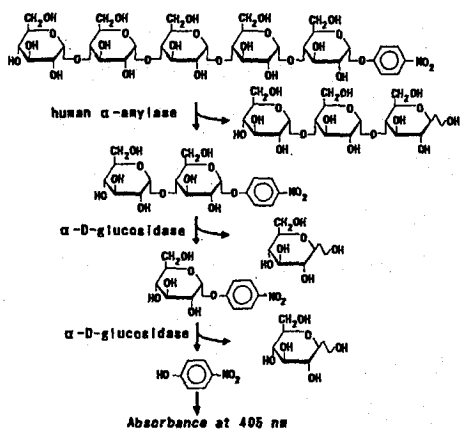


Fig. 1 The principle of α -amylase assay of human serum using a chromogenic substrate

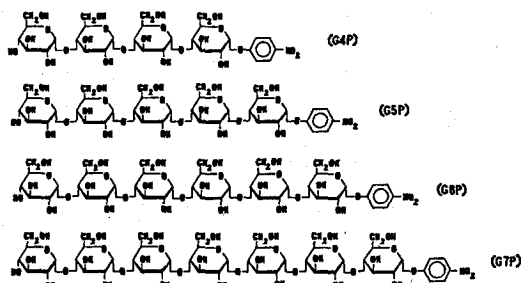


Fig. 2 Chemical structures of some substrates for human α -amylases

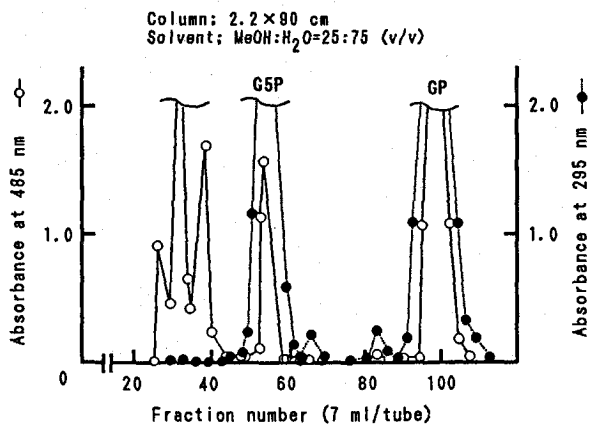


Fig. 3 Toyopearl HW-40S chromatographic separation of transfer products by G_4 -forming amylase

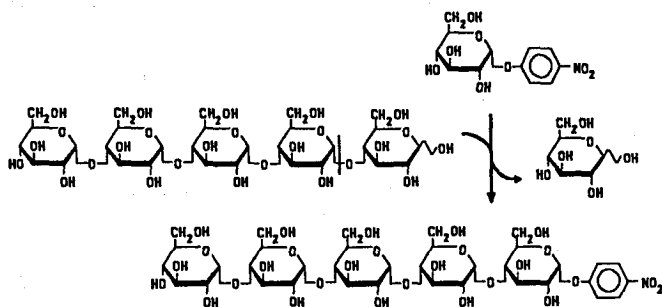


Fig. 4 Proposed mechanism of G5P production by G_4 -forming amylase from *Pseudomonas stutzeri*

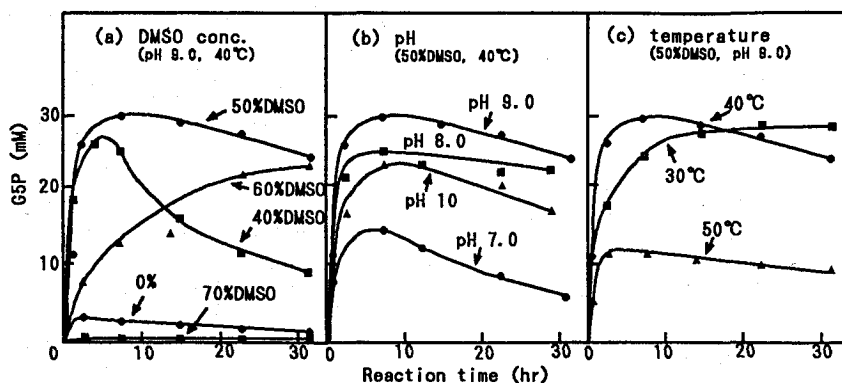


Fig. 5 Effect of DMSO concentrations, pH, and temperature on G5P production

Table. 1 Maltooligosaccharide derivative productions in aqueous-organic solvent system

Enzyme	Donor	Acceptor	Main Product	Solvent system	Relative* yield
G ₃ -forming amylase from <i>S. griseus</i>	G ₄	GP	G4P	50% DMSO	4.4
				25% 1-BtOH	2.8
G ₄ -forming amylase from <i>P. stutzeri</i>	G ₅	GP	G5P	50% DMSO	8.4
				50% MeOH	8.1
G ₅ -forming amylase from <i>B. licheniformis</i>	G ₆	GP	G6P	40% DMSO	3.6
				20% 1-BtOH	2.5
G ₆ -forming amylase from <i>K. pneumoniae</i>	G ₇	GP	G7P	30% MeOH	2.4
				30% EtOH	2.2

* The relative yield of each enzyme reaction was compared with that (at 1.0) free from organic solvent

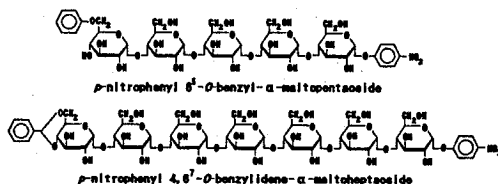


Fig. 6 Chemical structures of some substrates modified at nonreducing and D-glucosyl group

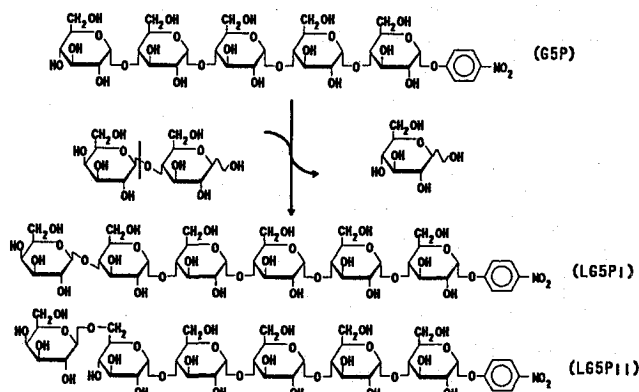


Fig. 7 Proposed mechanism of L65PI and L65PII productions by β -D-galactosidase

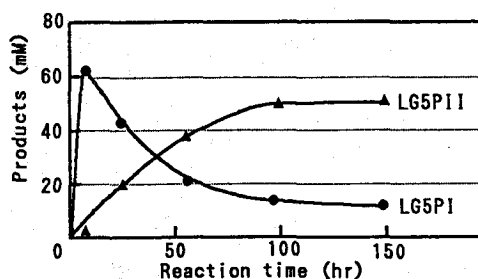


Fig. 8 Time course of LG5PI and LG5PII productions by β -D-galactosidase from *B. circulans*

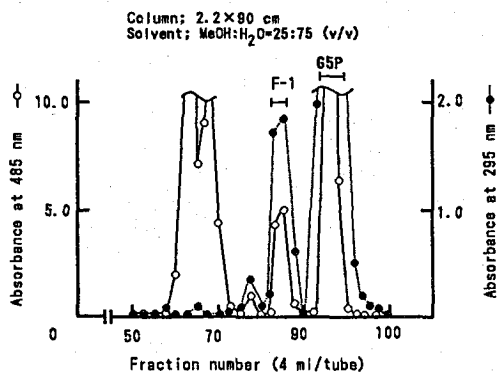


Fig. 9(a) Toyopearl HW-40S chromatographic separation of transfer products

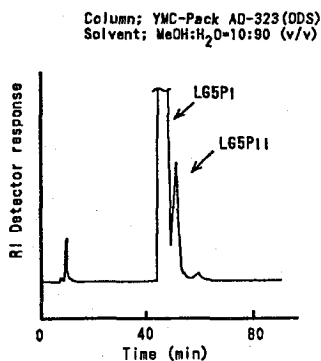


Fig. 9(b) Separation of F-1 fraction by HPLC

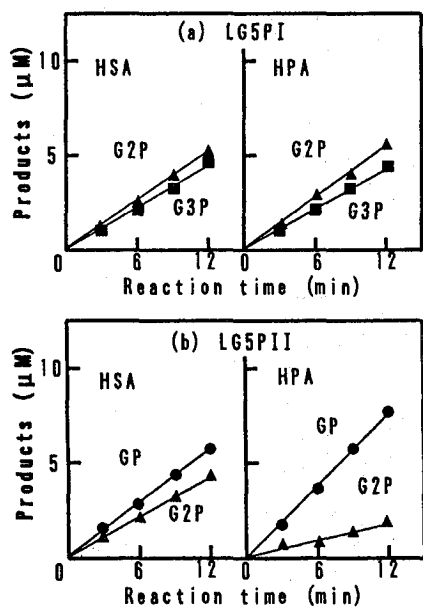


Fig. 10 Time course of products from LG5PI and LG5PII with two human α -amylases by HPLC

Substrate	Salivary α -amylase	Pancreatic α -amylase
	Catalytic center	Catalytic center
G5P	G-G-G-G-G-P (0.11*) G-G-G-G-G-P (0.83) G-G-G-G-G-P (0.06)	G-G-G-G-G-P (0.10) G-G-G-G-G-P (0.78) G-G-G-G-G-P (0.12)
LG5PI	L-G-G-G-G-G-P (0.49) L-G-G-G-G-G-P (0.51)	L-G-G-G-G-G-P (0.44) L-G-G-G-G-G-P (0.56)
LG5PII	L-G-G-G-G-G-P (0.44) L-G-G-G-G-G-P (0.56)	L-G-G-G-G-G-P (0.20) L-G-G-G-G-G-P (0.80)

*Frequency G=D-glucosyl residue L=D-galactosyl residue
P=p-nitrophenyl residue

Fig. 11 Schematic representation of the action of human α -amylases on substrates

Table 2 Kinetics of hydrolysis of substrates by human α -amylases

Substrate	Km (mM)		Relative rate	
	Salivary α -amylase	Pancreatic α -amylase	Salivary α -amylase	Pancreatic α -amylase
G5P	0.25	0.29	1.00*	1.00
LG5PI	0.10	0.12	0.90	0.91
LG5PII	1.10	1.18	0.60	0.61

*Value taken as unity

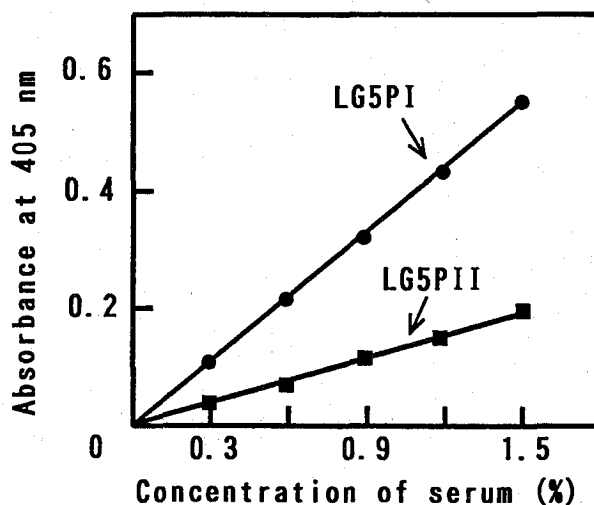


Fig. 12 Relationship between the concentration of serum (α -amylase) and the amount of liberated p-nitrophenol

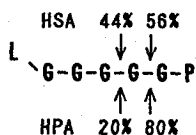


Fig. 13 Frequency of hydrolysis of LG5PII by human α -amylases

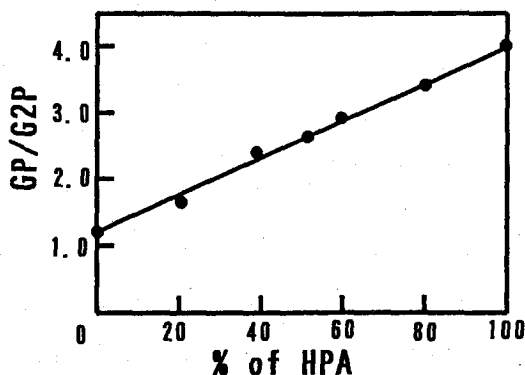


Fig. 14 Relationship between the ratio of HPA and HSA and the ratio of liberated GP to G2P

Table 3 Relative rates of hydrolysis of substrate by exo-amylases

Substrate	Relative rate		
	G ₃ -forming amylase	G ₄ -forming amylase	β -amylase
G5P	1.00*	1.00	1.00
LG5PI	0.41	0.22	-
LG5PII	0.01	0.13	-

* Value taken as unity

Substrate	G ₃ -forming amylase	G ₄ -forming amylase
	Catalytic center	Catalytic center
G5P	G-G-G-G-G-P (1.00*)	G-G-G-G-G-P (1.00)
LG5PI	L-G-G-G-G-G-P (0.95)	L-G-G-G-G-G-P (0.11)
	L-G-G-G-G-G-P (0.05)	L-G-G-G-G-G-P (0.67)
LG5PII	L-G-G-G-G-G-P (0.17)	L-G-G-G-G-G-P (0.22)
	L-G-G-G-G-G-P (0.83)	L-G-G-G-G-G-P (1.00)

*Frequency G=D-glucosyl residue L=D-galactosyl residue
P=p-nitrophenyl residue

Fig. 15 Schematic representation of the action of exo-amylases on substrates

Table 4 Kinetics of hydrolysis of substrate by porcine and human pancreatic α -amylases

Substrate	Km (mM)		Relative rate	
	Porcine α -amylase	Human α -amylase	Porcine α -amylase	Human α -amylase
G5P	0.10	0.29	1.00*	1.00
G6P	0.06	0.11	1.36	1.10
G4P	0.41	0.77	0.12	0.98
LG5PI	0.11	0.12	1.02	0.91
LG5PII	0.27	1.20	0.31	0.61

* Value taken as unity

Substrate	Porcine α -amylase	Human α -amylase
	Catalytic center	Catalytic center
G5P	G-G-G-G-G-P (0.96*) G-G-G-G-G-P (0.04)	G-G-G-G-G-P (0.10) G-G-G-G-G-P (0.78) G-G-G-G-G-P (0.12)
G6P	G-G-G-G-G-G-P (0.44) G-G-G-G-G-G-P (0.51) G-G-G-G-G-G-P (0.05)	G-G-G-G-G-G-P (0.12) G-G-G-G-G-G-P (0.41) G-G-G-G-G-G-P (0.47)
G4P	G-G-G-G-P (0.04) G-G-G-G-P (0.20) G-G-G-G-P (0.76)	G-G-G-G-P (0.08) G-G-G-G-P (0.38) G-G-G-G-P (0.54)
LG5PI	L-G-G-G-G-G-P (0.40) L-G-G-G-G-G-P (0.51) L-G-G-G-G-G-P (0.09)	L-G-G-G-G-G-P (0.44) L-G-G-G-G-G-P (0.56)
LG5PII	L-G-G-G-G-G-P (0.61) L-G-G-G-G-G-P (0.39)	L-G-G-G-G-G-P (0.20) L-G-G-G-G-G-P (0.80)

*Frequency G=D-glucosyl residue L=D-galactosyl residue
P=p-nitrophenyl residue

Fig. 16 Schematic representation of the action of porcine and human pancreatic α -amylases on substrates

審査結果の要旨

本論文は加水分解酵素として知られる α アミラーゼ及び β -D-ガラクトシダーゼを用い、新しいアミラーゼ活性測定基質P-ニトロフェニル4^s-O- β -Dガラクトピラノシル α -マルトペンタオシド (LG5P-I) 及びP-ニトロフェニル6^s-O- β -Dガラクトピラノシル α -マルトペンタオシド (LG5P-II) を開発した。本試薬は血中の α -アミラーゼの活性を測定し、すい臓疾患の診断に用いられる。本化合物はマルトオリゴ糖の還元末端にP-ニトロフェニル基を有し、又非還元末端の4位又は6位にガラクトシル基有し、従来の基質の欠点であった α -Dグルコシダーゼ及びグルコアミラーゼの水解作用を受けずすぐれた新規測定基質として現在実用化されている。又本基質は血中 α -アミラーゼ中すい臓起源のものとだ液起源のものとを分別定量が可能であり、すい臓疾患の診断にすぐれた性質を有している。

本試薬の合成は二段の酵素反応によって行われた。第一段としてマルトオリゴ糖生成アミラーゼの特異な糖転移反応を利用し重合度4-7のマルトオリゴ糖のP-ニトロフェニルマルトオリゴシドを合成した。ついで非還元末端にラクトースを供与基質として *B. circulans* 起源の β -Dガラクトシダーゼを用いてC-4及びC-6にガラクトースを導入した。

これらの酵素合成法は従来の有機合成法に比べ特殊な装置を必要とせず反応が特異的で副生成物がすくなく原料回収再利用も容易で工業的大量製造法に適したものであった。

これらの研究は酵素化学的にも又実用的にもきわめて独創性の高いもので博士(農学)を授与するにふさわしいものと考えられる。